

3/3,AB/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007602802

WPI Acc No: 1988-236734/198834

XRAM Acc No: C88-105870

XRPX Acc No: N88-179874

**New non A, non B hepatitis DNA and derived proteins - are useful as diagnostic reagents and in vaccines**

Patent Assignee: SEELIG R (SEEL-I); SEELING R (SEEL-I)

Inventor: BURCKHARDT J; SEELIG H P; BURKHARD J; SEELING H P; SEELING R

Number of Countries: 023 Number of Patents: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 279460	A	19880824	EP 88102469	A	19880219	198834 B
WO 8806184	A	19880825	WO 88EP123	A	19880219	198835
DE 3705512	A	19880901	DE 3705512	A	19870220	198836
ZA 8801081	A	19880811	ZA 881081	A	19880216	198845
AU 8813476	A	19880914				198849
NO 8804654	A	19881219				198905
DK 8805820	A	19881019				198906
DE 3744242	A	19890706	DE 3744242	A	19871224	198928
FI 8804823	A	19881019				198931
CN 8801839	A	19880928				198936
JP 1502956	W	19891012	JP 88501989	A	19880219	198947
DE 3705512	C	19911002				199140
SU 1711676	A3	19920207	WO 88EP123	A	19880219	199252
			SU 4356796	A	19891019	

Priority Applications (No Type Date): DE 3744242 A 19871224; DE 3705512 A 19870220

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 279460	A	G	24		
-----------	---	---	----	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

WO 8806184	A	G			
------------	---	---	--	--	--

Designated States (National): AU DK FI JP KR NO SU US

SU 1711676	A3		5	C12N-015/10	
------------	----	--	---	-------------	--

Abstract (Basic): SU 1711676 A

New non-A, non-B hepatitis (NANBH)-associated DNA comprises a specified 4998bp sequence (reproduced in the specification) or its functional equiv. or fragments. Also new are proteins (I) encoded by the above DNA.

A faecal sample from a patient with NANBH is suspended in buffer, centrifuged, the supernatant filtered sterile and pptd. with polyethylene glycol. The ppte. is incubated with RNase and DNase, then applied to a CsCl density gradient. The sepd. fractions were tested for presence of NANBH-associated substance by reaction with polystyrene beads coated with iodine-125 labelled IgG from a patient recovering from NANBH infection.

The active density fraction (1.29-1.32 g/l) was incubated with protease K, protein removed and DNA pptd. This was dissolved in buffer and incubated with Klenow polymerase, dATP, dTTP, dGTP and 32P-labelled dCTP, then enzyme inactivated and the reaction mixt. ligated with a phosphorylated EcoRI linker, forming a cloning vector. Alternatively,

the radiolabelled DNA prepd. above is ligated with EcoRI-digested lambda phage 1149; the incubation mixt. packaged in phage envelopes and the packaged phages used to infect E. coli NM514. Analysis of the transformants by hybridisation indicated the presence, in the phage, of inserts of 0.3-1.5 kb. One fragment, 0.45 kb, was removed with EcoRI, purified and then subcloned in pUC19, and the recombinant used to transform E.coli DH1.

USE - The DNA is useful (a) as hybridisation probes for diagnosing NANBH (by analysis of faeces, blood, liver tissue etc.); (b) for expressing (I) in suitable vectors, and (c) in the construction of synthetic viruses. (I) are useful in vaccines and as immunological diagnostic reagents. Bul.5/7.2.9

EP 279460 A

New non-A, non-B hepatitis (NANBH)-associated DNA comprises a specified 4998bp sequence (reproduced in the specification) or its functional equiv. or fragments. Also new are proteins (I) encoded by the above DNA.

A faecal sample from a patient with NANBH is suspended in buffer, centrifuged, the supernatant filtered sterile and pptd. with polyethylene glycol. The ppte. is incubated with RNase and DNase, then applied to a CsCe density gradient. The sepd. fractions were tested for presence of NANBH-associated substance by reaction with polystyrene beads coated with iodine-125 labelled IgG from a patient recovering from NANBH infection. The active density fraction (1.29-1.32 g/l) was incubated with protease K, protein removed and DNA pptd.. This was dissolved in buffer and incubated with klenow polymerase, dATP, dTTP, dETP and 32P-labelled dCTP, then enzyme inactivated and the reaction mixt. ligated with a phosphorylated ECORI-linker, forming a cloning vector.

USE/ADVANTAGE - The DNA is useful (a) as hybridisation probes for diagnosing NANBH (by analysis of faeces, blood, liver tissue etc.); (b) for expressing (I) in suitable vectors, and (c) in construction of synthetic viruses. (I) are useful in vaccines and as immunological diagnostic reagents.

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer:

**0 279 460  
A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88102469.9

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>: **C12N 15/00**, **A61K 39/29**,  
**C12Q 1/68**, **G01N 33/576**

(22) Anmeldetag: 19.02.88

(30) Priorität: 20.02.87 DE 3705512  
24.12.87 DE 3744242

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
24.08.88 Patentblatt 88/34

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: Seelig, Renate, Dr.  
Kriegstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)

Anmelder: Seelig, Hans Peter, Prof. Dr.  
Kriegstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)

Anmelder: Burckhardt, Jean, Dr.  
Kriegsstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)

(72) Erfinder: Seelig, Renate, Dr.  
Kriegstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)  
Erfinder: Seelig, Hans Peter, Prof. Dr.  
Kriegstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)  
Erfinder: Burckhardt, Jean, Dr.  
Kriegsstrasse 99  
D-7500 Karlsruhe(DE)

(74) Vertreter: Deufel, Paul, Dr. et al  
Patentanwälte Müller-Boré, Deufel, Schön,  
Hertel, Lewald, Otto Isartorplatz 6 Postfach  
26 02 47  
D-8000 München 26(DE)

(54) **Virusantigen, Verfahren zu seiner Gewinnung und Anwendung in Diagnose und Therapie (Impfstoff).**

EP 0 279 460 A1

(57) Die Erfindung betrifft eine Non-A,Non-B-Hepatitis assoziierte DNA von etwa 5 KB, ein Verfahren zur Herstellung derselben nach an sich bekannten Methoden und die Verwendung dieser DNA oder von Fragmenten davon zur Diagnose von Non-A,Non-B-Hepatitis sowie zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung von immunologischen Reagentien für den Nachweis von Non-A,Non-B-Hepatitis oder zur Erzeugung von Vaccinen. Die DNA und Fragmente derselben können geklont und auch in geeignete Vektoren eingesetzt werden, um Virusexpressions-

produkte zu liefern.

## Virusantigen, Verfahren zu seiner Gewinnung und Anwendung in Diagnose und Therapie (Impfstoff)

Non-A, Non-B-Hepatitis-erkrankungen sind in der Literatur ausführlich und zahlreich beschrieben. Ebenso bekannt sind aber die Schwierigkeiten der Erfassung des NANBH-Virus und Nachweis der Krankheit.

Es wurden nun aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitispatienten Partikel isoliert und bezüglich ihres Molekulargewichts und ihrer Beschaffenheit charakterisiert sowie ein Nachweisverfahren auf das Vorhandensein solcher Partikel gefunden und der Nachweis dieser Partikel zur Diagnose des Vorliegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis bei leberkranken Patienten angewandt.

Aus den aus dem Stuhl isolierten Partikeln wurde DNA isoliert und nach herkömmlichen Methoden kloniert. Die so erhaltenen klonierten DNA-Stränge wurden zum Nachweis des Vorliegens homologer oder sehr ähnlicher DNA wiederum im Stuhl, Serum, Lebergewebe und Körperflüssigkeiten von leberkranken Patienten verwendet, bei denen auf diesem Wege eine Non-A, Non-B-Hepatitis mit hinreichender Wahrscheinlichkeit diagnostiziert werden kann.

Die Erfindung betrifft also zusammengefaßt die Isolierung Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel, deren DNA sowie das Klonieren von DNA und die Verwendung sowohl dieser Partikel als auch der erhaltenen DNA-Klone zur Eingrenzung von Lebererkrankungen auf das Vorliegen einer Non-A, Non-B-Hepatitis. Weitere Aspekte der Erfindung liegen in der Entwicklung von erweiterten Nachweisverfahren und schließlich auch Impfstoffen auf Basis der zu erhaltenden Antikörper und durch Synthese synthetischer Peptide mit der Sequenz der Partikel, die diesen Virusproteinen entspricht und die sich aus der Sequenz der klonierten DNA vorhersagen läßt.

Aus den Stuhlproben Non-A, Non-B-Hepatitis erkrankter Patienten wurde eine Substanz isoliert, die sich signifikant gehäuft im Stuhl solcher Non-A-Non-B-Hepatitis-Patienten findet, dagegen bei gesunden, sowie bei Patienten mit Lebererkrankungen anderer Genese in signifikant geringerem Ausmaß findet. Ein Verfahren zum Nachweis dieser Substanz wurde entwickelt, worin Polystyrolbeads mit verdünntem Serum von Non-A, Non-B-Hepatitis-Rekonvaleszenten beschichtet werden. Die gewaschenen beads werden dann mit einer 10 %-igen Stuhlsuspension eines zu untersuchenden Probanden inkubiert, wobei evtl. vorhandene Non-A-Non-B-Hepatitis assoziierte Substanz an die in dem Rekonvaleszentenserum enthaltenen, an die Polystyrolkugeln gebundenen Antikörper gegen diese Substanz bindet und so immobilisiert wird. Die Bindung der Non-A, Non-B-Hepatitis assoziierten

Teilchen kann nachgewiesen werden durch Bindung von menschlichem IgG wiederum aus Rekonvaleszentenserum von Non-A-Non-B-Hepatitis-Patienten, das mit Jod 125 radioaktiv markiert ist. Bei Vorliegen der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz im Stuhl des Probanden wird radioaktives Immunglobulin an diese gebunden und das entsprechende Signal zum Nachweis verwendet.

Bei Verwendung dieses Nachweisverfahrens für die Hepatitis-Non-A-Non-B-assoziierte Substanz in großen Kollektiven von Patienten mit Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese zeigte es sich, daß diese Substanz hochsignifikant gehäuft bei Patienten mit gesicherter Hepatitis Non-A, Non-B im Stuhl nachweisbar ist (s. Tabelle 1). Bei Patienten mit anderen Lebererkrankungen, bei denen eine Non-A, Non-B-Hepatitis eher unwahrscheinlich ist, die teilweise in ihrem klinischen Bild jedoch einer akuten oder abgelaufenen Non-A, Non-B-Hepatitis ähneln können, insbesondere auch bei Patienten mit einer akuten unabgelaufenen Hepatitis A oder B fand sich dagegen nur in äußerst wenigen Fällen die Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Substanz (s. Tabellen 2 und 3). Hieraus ergibt sich, daß das Vorliegen dieser Substanz einen deutlichen Hinweis auf die Ätiologie einer zunächst unbekannten, entzündlichen Lebererkrankung liefern kann, und daß der Nachweis dieser Substanz daher eine Untersuchung von hohem diagnostischem Wert zum Nachweis oder Ausschluß des Vorliegens einer Non-A, Non-B-Hepatitis liefern kann.

Die mit der Non-A, Non-B assoziierte Substanz weist somit eine hohe Affinität gegenüber menschlichen Immunglobulinen und Fibronectin sowie dessen nicht kollagenbindenden Spaltprodukten auf. Die Bindung an Fab-2-Bruchstücke aus dem IgG gesunder und Hepatitis Non-A, Non-B-rekonvaleszenter Personen spricht gegen eine unspezifische Bindung der assoziierten Substanz an dem Fc-Teil der Immunglobuline. Die hohe Affinität gegenüber Fibronectin und dessen nicht kollagenbindenden Spaltprodukten ist eine Eigenschaft, die diese Substanz mit antigenen Proteinen anderer Viren gemeinsam hat (Seelig und Mitarbeiter 1983). Behandlung mit organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Äther) und mit Hitze (70°C, 10 min.) zerstört die Bindungsaffinität der Non-A, Non-B assoziierten Substanz nicht. Während die Verdauung mit Chymotrypsin, Trypsin, Elastase und Neuraminidase keinen Einfluß auf die Bindungseigenschaften der Substanz zeigt, führt die Verdauung mit Papain zu einem vollständigen und schnellen Verlust der Bindungsaffinität.

Nach Zentrifugation bei 150.000 g, 2 Std., läßt sie sich im Sediment nachweisen und stellt sich nach 72-stündiger Laufzeit bei einer Dichte von 1,3 (1,29 - 1,32) g/ml Cäsiumchlorid ein. Nach Auftrennung der bei 1,30 g/ml Cäsiumchloridbandenden Fraktion über eine Gradienten-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden in der Silberfärbung mehrere Bande unterschiedlichen Molekulargewichts dargestellt. Nach Transfer auf Nitrocellulose lassen sich im Western-Blot mit radioaktiv markierten IgG und Fab-2-Fragmenten von Non-A, Non-B Hepatitis-Patienten und gesunden Probanden Bande darstellen, die bei Extraktion gesunder Kontrollstühle nicht auftreten. Insgesamt werden 4 Banden dargestellt, zwei gut sichtbare Hauptbande mit einem geschätzten Molekulargewicht von ca. 64.000 und 58.000 sowie zwei schwächere Bande mit einem geschätzten Molekulargewicht von 51.000 und 43.000. Die Banden mit Fab-2-Bruchstücken sind schwächer und zeigen einen höheren Background. Die Auftrennung von Rohstuhlkonzentraten ohne Cäsiumchlorid-Reinigung nach SDS-Page und Blotting zeigten in positiven Stühlen die beiden Hauptbande mit einem ungefähren Molekulargewicht um 60.000.

Bei weiterer Analyse der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Partikel ließ sich DNA isolieren und mit herkömmlichen Methoden in Fragmenten klonieren. Diese klonierten DNA-Fragmente aus dem Stuhl von Non-A, Non-B-Hepatitis-Patienten konnten als DNA-Sonden für die Untersuchung des Stuhls, Serums, Lebergewebe und Körperflüssigkeiten sowie Blutkonserven und Plasmaprodukten anderer Patienten mit Verdacht auf das Vorliegen einer Non-A, Non-B-Hepatitis verwendet werden. Mit den klassischen Hybridisierungsverfahren läßt sich so zeigen, ob in den unbekannten Stühlen DNA vorliegt, deren Sequenz der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten DNA der erhaltenen Klone so ähnlich ist, daß sich ein Hybridisierungssignal zeigt. Mit diesem weiteren Nachweisverfahren für Hepatitis Non-A, Non-B-assoziierten DNA-Sequenzen konnten dann Proben von Probanden untersucht werden auf das Vorliegen von Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten DNA. Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, daß es sich bei der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz um ein Viruspartikel handelt und daß es sich bei der isolierten DNA-Sequenz um eine Sequenz einer Virus-DNA handelt, wie das Aufschlußverfahren einerseits und andererseits die Sequenz selbst zeigen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

Isolierung der Non-A-Non-B-Hepatitis assoziierten Substanz aus Patientenstuhl.

Verwendeter Puffer: Tris-HCl, pH 7,4; 0,05 N in allen Arbeitsschritten

#### a) Aufarbeitung:

0,5 g Stuhl werden in 10 ml Puffer suspendiert, bei 8.000 g zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Der Rückstand wird noch einmal mit 10 ml und anschließend mit 5 ml Puffer ausgewaschen. Die gesammelten Überstände werden zentrifugiert (30 min., 10.000 rpm) und durch ein bakteriendichtes Filter filtriert (Millipore 0,22 µm). Der Überstand wird mit PEG 6000 (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) präzipitiert. Nach mindestens 2 und höchstens 12 Stunden wird das Präzipitat abzentrifugiert und in 10 ml Puffer gelöst. Diese Lösung wird mit 10 ml Freon ausgeschüttelt, die Phasen durch Zentrifugation getrennt, die Freonphase noch einmal mit 5 ml Puffer gewaschen. Die Fällung mit PEG und NaCl (Endkonzentration 10% bzw. 0,4 mol/l) wird wiederholt, das Präzipitat in ca. 800 µl Puffer aufgenommen.

Die so erhaltene Lösung wird mit RNase und DNase 1 Std. bei 37°C verdaut (800 µl PEG-Präzipitat in Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 0,05 M; 2.800 U RNase und 1.500 U DNase, proteasenfreie Präparationen, Boehringer). Isolierungen, die nicht zur Extraktion von DNA dienen, können ohne diesen Schritt durchgeführt werden.

Nach Verdauung mit DNase und RNase wird das Inkubat auf einen Cäsiumchlorid-Gradienten gebracht.

#### b) Isolierung der Non-A, Non-B assoziierten Substanz über einen Cäsiumchlorid-Gradienten.

Die Zentrifugenröhrchen werden mit 1 ml Cäsiumchlorid-Lösung mit einer Dichte von 1,4 g/ml gegeben und mit je 3 ml Cäsiumchlorid von einer Dichte von 1,3 g, 1,25 g und 1,2 g/ml überschichtet. Alle Cäsiumchlorid-Lösungen werden mit dem oben genannten Puffer hergestellt, der Gradient wird mit 800 µl Stuhlextrakt überschichtet, die Zentrifugationsdauer beträgt 65 - 72 Stunden. Temperatur + 10°C, rpm 31.000. Nach Beendigung der Laufzeit wird der Gradient im unteren Bereich (Dichte 1,2 - 1,4) in Fraktionen von ca. 200 µl gesammelt, im oberen Bereich Dichte 1,1 - 1,2 können größere Fraktionen entnommen werden. Die Dichte jeder Fraktion wird durch Messung des Brechungsindex bestimmt. Alle Fraktionen werden ausgiebig gegen Puffer dialysiert und 50 µl jeder

Fraktion in NANB-Assay auf Non-A, Non-B assoziierende Substanz untersucht. Von den positiven Fraktionen wird die Eiweißkonzentration nach Lowry bestimmt.

Verifizierung und Charakterisierung der Substanz

#### c) Herstellung einer Gradienten-Page

Zwei Lösungen mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen werden durch einen Gradientenmischer zu einem linearen Gradienten aufgeschichtet. Die Lösung mit der höheren AA-Konzentration enthält außerdem 15 % Saccharose, um Turbulenzen zu verhindern. Ansonsten sind die Lösungen zusammengesetzt wie bei LAEMMLI (1970) beschrieben. Dies gilt auch für das Kammgel.

Die dialysierten und evtl. eingeeengten Fraktionen des Cäsiumchlorid-Gradienten werden mit 10  $\mu$ l SDS, 10  $\mu$ l Glycerin und 5  $\mu$ l beta-Mercaptoäthanol, 5  $\mu$ l Bromophenolblau pro 100  $\mu$ l Probe versetzt und 3 Min. im Wasserbad gekocht. Danach werden sie mit 5  $\mu$ l 0,1%igem Pyronin versetzt und auf das Gel aufgetragen. Laufzeit 3 1/2 Stunden, Spannung 160 - 300 V, Stromstärke 40 - 25 A, Leistung 20 W.

Ca. 5 Min. vor Ende des Laufes wird noch einmal 5  $\mu$ l Pyronin aufgetragen und der Lauf beendet, sobald Pyronin das Kammgel durchlaufen hat. Das Gel wird entweder mit Silber gefärbt (WRAY und Mitarbeiter 1981) oder ein Western-Blotting durchgeführt (TOWBIN und Mitarbeiter 1979). Das Blotting wird über Nacht bei 0,5 A, anschließend 1 Std. bei 1 A durchgeführt.

#### d) Behandlung von Western-Blots

Nach Beendigung des Blotting werden die verschiedenen Streifen (an den Pyroninmarkierungen kenntlich) ausgeschnitten und mitgeführte Molekulargewichtstandards mit Amido schwarz gefärbt. Probenstreifen werden 24 - 72 Stunden in 1%iger Gelatine PBS-Lösung geschüttelt. Die IgG-Fraktion eines Patienten bzw. die Fab-2-Fragmente dieser IgG-Fraktion werden mit Jod 125 (Chloramin T) markiert: 0,5 mCi auf 100  $\mu$ g Protein. Dabei werden etwa 70 % der Aktivität inkorporiert. Der Tracer, dessen Volumen ca. 2  $\mu$ g Protein entsprechen sollte, wird in 20 ml Gelatine/PBS verdünnt und damit die Streifen 12 Stunden unter Schütteln inkubiert. Danach werden die Streifen je 1 Stunde 3  $\times$  mit Gelatine-PBS, 2  $\times$  mit PBS-Tween 0,5 % und 1  $\times$  mit Wasser gewaschen. Nach Trocknen der Streifen werden diese auf einen empfindlichen Röntgenfilm aufgelegt und bei -70°C 2 - 7 Tage exponiert.

#### Beispiel 2

Nachweismethode für HNANB-assoziierte Substanz im Stuhl

Polystyrol Beads (Plasticball company, Chicago) wurden mit Serum von rekonvaleszenten Patienten mit Non-A, Non-B-Hepatitis in einer Verdünnung von 1:200 in Carbonatpuffer, pH 9,2, 0,01 Mol/l, 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die so beschichteten beads wurden mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) ausgiebig gewaschen. Die Stuhlproben wurden in Form einer 10 %-igen Stuhlsuspension (g/V) 2 Stunden bei 37°C mit den wie oben geschichteten Polystyrol Beads inkubiert, danach ausgiebig mit PBS, die 0,5 % Tween 20 enthielt, gewaschen und danach 1 Stunde mit humanem IgG aus dem Serum von Rekonvaleszenten von einer Non-A, Non-B-Hepatitis, das mit Jod 125 markiert war, bei 37°C inkubiert. Nach neuerlichem, ausführlichem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die an die Beads gebundene Radioaktivität in einem Gamma-Counter ausgezählt. Stuhlproben, bei denen die gebundene Radioaktivität den dreifachen Wert der Negativkontrolle erreichte, wurden als positiv für das Vorliegen der Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierten Substanz befunden.

Jede der beigefügten Tabellen 1 bis 4 wurde wie oben beschrieben erstellt und nach den angegebenen Kriterien ausgewertet. Es wurde festgestellt, daß gemäß Tabelle 1 bei Patienten einer gesicherten Non-A, Non-B-Hepatitis diese Substanz in einem großen Prozentsatz der Fälle gefunden wurde,

daß gemäß Tabelle 2 bei Verwendung dieses Essays für diese Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Substanz bei einem Patientenkollektiv mit einer Vielzahl von ganz unterschiedlichen Lebererkrankungen, die aber nichts mit einer Non-A, Non-B-Hepatitis zu tun haben, die Substanz, wenn überhaupt, nur in sehr niedrigen Prozentsätzen gefunden wird.

Tabelle 3 zeigt, daß man während der Untersuchung von Patientenkollektiven mit Hepatitis anderer Genese, also entweder Hepatitis A oder Hepatitis B zu einem sehr niedrigen Prozentsatz die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz findet.

Es ist festzustellen, daß man bei den Non-A, Non-B-Hepatitis-Fällen praktisch immer, also fast 30% positive Befunde hat, wohingegen bei den Hepatitis A, Hepatitis A-Verdacht, Hepatitis B und Posthepatitis B Patienten die Zahlen erheblich niedriger liegen.

Die relative hohe positive Anzahl für die Substanz bei chronischen Hepatitis B-Patienten läßt vermuten, daß es sich um eine Doppelinfektion mit

Non-A, Non-B und Hepatitis B handelt.

Tabelle 4 zeigt folgendes: Eine Untersuchung an Empfängern mit einer Bluttransfusion, die prinzipiell als Risikopatienten zu gelten haben, weil bei Bluttransfusionen häufig eine Non-A, Non-B-Hepatitis Infektion eintritt. Es handelt sich um eine prospektive Studie.

Hieraus ergibt sich sehr deutlich, daß abhängig vom Schweregrad der Folgen der Transfusion einerseits Patienten gar nichts geschehen ist, wo also diese Substanzen nur in sehr geringem Maße ausgeschieden worden ist, andererseits bei Patienten, bei denen die Krankheit erkennbar ist und bei denen, die eine ganz manifeste Hepatitis haben, in über 70 % der Fälle diese Substanz nachweisbar ist.

**Beispiel 3:** Isolierung von DNA aus dem Stuhl und Klonierung von DNA-Sequenzen und deren Einbau in entsprechende Vektoren.

Einbau dieser DNA in Klonierungsvektoren.

Aus dem Stuhl von Patienten mit Non-A, Non-B-Hepatitis wurden, wie in Beispiel 1 beschrieben, Non-A, Non-B-Hepatitis-assoziierte Partikel isoliert und, wie dort beschrieben, mit RNAs und DNAs behandelt und über einen Cäsiumchlorid-Gradienten gereinigt und ausgiebig dialysiert. Die dialysierten Fraktionen wurden auf die oben beschriebene Art auf die Anwesenheit von NANB-assoziiierter Substanz untersucht. Die Fraktion der Dichte von 1,3 g/ml im Cäsiumchloridgradienten wurde mit 50 Mikrogramm Proteinase K, 1 % SDS und EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM/l 6 Stunden bei 37°C verdaut. Proteine wurden durch Extraktion mit 80 %-igem Phenol (Gewicht/Volumen) und Chloroform entfernt, und daraufhin die in der wässrigen Phase gelöste DNA in Gegenwart von 0,3 Mol/l Natriumacetat mit einem zweieinhalb-fachen Volumen an Äthanol für 60 Stunden bei -70°C gefällt. Danach wurde zentrifugiert und das Sediment einmal mit 70 %-igem Äthanol gewaschen, getrocknet und daraufhin in TE-Puffer bestehend aus 10 mmol/l Tris, pH 8,0, und 1 mmol/l EDTA, in einem Volumenverhältnis von einem Mikroliter/5 mg aufgearbeitetem Stuhl, aufgenommen.

15 Mikroliter dieser DNA-Stammlösung wurden in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 Mikroliter mit 6 Einheiten Klenow-Polymerase (DNA-Polymerase I, großes Fragment), 1 Mikroliter einer Lösung von dATP, dTTP und dGTP, jeweils in einer Konzentration von 1 mM/l, sowie 5 Mikroliter alpha-32P-dCTP (3.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) im Inkubationspuffer für Klenow-Polymerase nach den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) 1

Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden 2,5 Mikroliter einer 1 mMol/l dCTP-Lösung zugegeben und die Probe eine weitere Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzen auf 68°C für 10 Minuten wurde die Reaktionslösung auf 0°C abgekühlt. Danach wurde das Reaktionsgemisch zusammen mit 2 Einheiten T4-DNA-Ligase, 1 Mikrogramm phosphorylierter EcoR-I-Linker und 6 Mikroliter 10 mM ATP-Lösung für 16 Stunden bei 16°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde danach auf eine Endkonzentration von 150 mMol/l NaCl eingestellt und mit 240 Einheiten EcoR-I Restriktionsendonuclease (80 Einheiten/Mikroliter) 3 Stunden bei 37°C verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 Mikroliter 80 %-igem Phenol und 1 Mikroliter 20 %-igem SDS gestoppt. Die radioaktiv markierte und mit Linkern versehene DNA wurde von Salz und nicht legierten Linkern über eine Sepharose 4B-CL-Säule (3 ml Säulenvolumen, 25 cm Länge) abgetrennt und mit 2,5 Volumina Äthanol 16 Stunden bei -70°C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde 10 Min. bei 14.000 g zentrifugiert und das Sediment bei 150 Mikroliter 70 %-igem Alkohol gewaschen, getrocknet und in 10 Mikroliter TE-Puffer aufgenommen.

**Beispiel 4:** Einbau der isolierten DNA in lambda-Phagen und Transfektion auf Bakterien.

Zur Ligation mit der Vektor-DNA wurden 2 Mikrogramm DNA des Phagen-lambda 1149 mit 2 Einheiten EcoR-I (4 E/Mikroliter) in einem Gesamtreaktionsvolumen von 6 Mikroliter (Inkubationspuffer nach Angabe des Enzymherstellers (Boehringer, Mannheim) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurde das Enzym durch 10-minütiges Erhitzen auf 68°C inaktiviert. Diese Lösung wurde mit 3 Mikroliter markierter DNA, die wie im vorigen Beispiel beschrieben, isoliert wurde, 1 Mikroliter 5 mM ATP und 1 unit T4-DNA-Ligase bei Raumtemperatur ligiert. 4 Mikroliter dieses Reaktionsansatzes wurden in lambda-Phagenhüllen verpackt (unter Verwendung eines fertigen Verpackungsextrakts der Firma Giga-Pack, Vector-cloning systems). Mit diesen verpackten Phagen wurde der Escherichia Coli Stamm NM 514 infiziert. Zum screening auf das Vorhandensein eingebauter DNA wurden ca.  $10^3$  "plaque forming units" auf 22 x 22 cm screening plates der Firma Nunc ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Phagen-DNA wurde auf Nitrozellulosefilter durch Abklatsch übertragen und die so erhaltenen Abklatschfilter wurden mit 1 Mikroliter der oben beschriebenen radioaktiven DNA Stammlösung gemäß Maniatis et al. (1982) hybridisiert, gewaschen und 6 Std. bei 70°C autoradiographiert.

Von 70 positiven Hybridisierungssignalen wurden 17 zugeordnete Phagenkolonien in einer Dichte von ca. 5 Plaques pro cm<sup>2</sup> ausplaziert. Nach plaques purification nach BENTON und DAVIS (1978) wurden von den schließlich erhaltenen 16 positiven Plaques Lysate hergestellt. Mehrere dieser Phagen enthielten DNA-Inserte in einer Länge zwischen 0,3 und etwa 1,5 KB, die mit einer Probe der ursprünglichen DNA-Stammlösung hybridisiert.

**Beispiel 5:** Charakterisierung eines DNA-Fragmentes von 0,45 KB und Subklonierung dieses Fragmentes in einem Plasmid PUC 19 in *Escherichia coli*.

Das DNA-Fragment wurde durch Verdauung mit entsprechenden Restriktionsendonucleasen (EcoR-I) unter den oben bereits beschriebenen Bedingungen aus dem der Phagen DNA entfernt, das Fragment dann auf Agarose Gel von der lambda-Phagen DNA getrennt und die dem Insert entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Die solchermaßen isolierte Insert-DNA wird dann genau wie oben beschrieben, in Vektor-DNA PUC 19 hineinligiert und dann auf *Escherichia coli* Stamm DH 1 transfiziert. Nach Selektion von Bakterienstämmen, die dieses Plasmid mit dem eingebauten Hepatitis Non-A, Non-B-DNA-Insert aufgenommen haben und vermehren wurde die Züchtung dann durchgeführt und wie bei T. Maniatis et al. 1982, in "Molecular Cloning, a laboratory manual," beschrieben, aufgearbeitet.

Das gleiche Insert wurde radioaktiv markiert und mit Southern-Analyse auf Hybridisierung mit dem DNS-Ausgangsmaterial, DNS-Extraktionen aus Stühlen von Kontrollpersonen, Hepatitis B-Virus-DNS und *Escherichia coli* Plasmid PBR 322 geprüft.

**Beispiel 6:** Nachweis von Non-A, Non-B-assoziiierter DNA im Serum

2 - 5 ml Serum werden bei 150.000 g 2 Stunden zentrifugiert. Das Sediment wird in 200 µl Proteinase K-Lösung (0,5 mg/ml + 10 mmol EDTA) bei 37°C 1 Stunde verdaut. Danach werden zu dieser Lösung 165 µl einer heiß gesättigten Natriumjod Lösung (2,5 g Natriumjodid/ml H<sub>2</sub>O,

75°C) gegeben (Endkonzentration 12,5 M). Diese Lösung wird 10 Minuten auf 90°C erhitzt und unmittelbar durch Nitrozellulosefilter mittels Vakuum filtriert (Dot-Blot-Apparatur, Schleicher + Schüll). Nach der Filtration wird die Nitrozellulosefolie 3 × mit 70%igem Äthanol gewaschen und darauf 10 Min. bei Raumtemperatur in 100 ml Essigsäureanhydrid (100 ml 0,1 M Triäthanolamin + 250 µl Essigsäureanhydrid) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Folie im Vakuum bei 80°C 1 - 2 Stunden gebacken. Die trockene Folie wird in Vorhybridisierungslösung gebracht und 3 Stunden bei 65°C inkubiert (6 × SSC, 1 × Denhardt, 0,5 % SDS, 20 µg/ml Hitze denaturierte Heringssperma-DNS entsprechend den Angaben in: Maniatis, Molecular Cloning, 1982). Mittels Nick-Translation (siehe Maniatis, Molecular Cloning, 1982) mit 32P-markierte Probe über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosefolie 3 × gewaschen (1) 6 × SSC, 1 × Denhardt, 0,5 % SDS, 20 µg/ml Heringssperma-DNA, 2). 1 × SSC, 0,5 % SDS, 1 × Denhardt, 3). 0,1 × SSC + 0,05 % SDS). Nach Trocknen der Folie wird diese auf einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat) aufgelegt (Autoradiographiezeit 6 Stunden bis 2 Tage bei -70°C).

Bei Seren mit hohem Gehalt an HNANB-Viren kann die Ankonzentrierung von 2-5 ml Serum durch Zentrifugation entfallen und die Seren nach Proteinase-K-Verdauung entsprechend der Methode (Seelig et al., kliniker 2/1985, Seite 86 ff) direkt auf Nitrozellulose aufgetragen werden. (s. Bsp. 7)

#### **Beispiel 7: HNANB-DNA-Nachweis im Serum**

200 µl Serum werden mit 75 µl Proteinase K-Lösung (Boehringer) (4 mg/ml) und 25 µl 0,5 M EDTA bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Das Inkubat wird mit 100 µl 1 N NaOH 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit 250 µl 2 M NH<sub>4</sub>OAc neutralisiert. 500 µl des Ansatzes (entsprechend 181 µl Serum) werden auf Nitrozellulose aufgetragen (Dott-Blott-Apparatur Schleicher + Schüll). Nach nochmaliger Neutralisierung mit 250 µl 2 M NH<sub>4</sub>OAc werden die Filter in Vakuum bei 80°C 45 Minuten getrocknet. Die Filter werden in 6 × SSC + 0,5 % SDS + 1 × Denhardt-Lösung und 20 µl/ml Hitze denaturierter (5 Minuten, 100°C)

\* 20 × SSC (Standard Saline Citrat) entspricht 3 M NaCl, 1,5 M Natriumcitrat.

\*\* SDS Natriumdodecylsulfat.

\*\*\* 100 × Denhardt-Lösung entspricht 2 % Ficoll; 2 % Polyvinylpyrrolidon, 2 % Bovin Serumalbumin.



Heringsperma-DNA bei 65°C 3 Stunden prähybridisiert. Zur Hybridisierung die über Nacht unter Prähybridisierungsbedingungen erfolgt, wird das durch Nick-Translation mit  $^{32}\text{P}$ -markierten Inserts der Phagenclore verwendet (spezifische Aktivität ca.  $1 - 2 \times 10^9$  cpm/ug DNA). Die Filter werden danach jeweils einmal 20 Minuten bei 65°C mit  $6 \times \text{SSC}$ ,  $1 \times \text{Denhardt}$ -Lösung, 0,5 % SDS, 20 ug/ml denaturierter Heringssperma-DNA, danach mit  $1 \times \text{SSC}$ , 0,5 % SDS  $1 \times \text{Denhardt}$ -Lösung und  $0,1 \times \text{SSC}$ , 0,05 % SDS gewaschen und bei 80°C getrocknet. Die Autoradiographie erfolgt mittels Röntgenfilm und Verstärkerfolie (intensiv fying screens Kodak) mit einer Autoradiographiezeit von 6 - 48 Stunden bei -70°C.

#### Beispiel 8

Dieses Beispiel zeigt eine einfachere Variante bezüglich der Probenvorbereitung zum Dot Blot:

1 ml Serum wird mit 350  $\mu\text{l}$  Proteinase K-Lösung (3 mg/ml Proteinase K, 10 mM TRIS pH 7,5, 0,5 mM EDTA, 0,5 % SDS) und 125  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA 30 Min. bei 37°C inkubiert. Darauf wird die Lösung mit 8 ml 2 M TCA (pH 7,0), 3,2 ml 2 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 20  $\mu\text{l}$  t RNA (10 mg/ml) und 5,3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  auf 16 ml verdünnt und die DNA mit 10 ml Isopropanol bei Raumtemperatur für 30 Min. gefällt. Die DNA wird abzentrifugiert (15 Min. bei 8000rpm), das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 600  $\mu\text{l}$  10 mM TRIS pH 8,4 und 1 mM EDTA aufgenommen, einmal mit Phenol, einmal mit Chloroform extrahiert und nochmals gefällt. Aliquots der gefüllten DNA können für die Dot Blots oder für Restriktionsanalysen eingesetzt werden.

Die Darstellung von partikelassoziierter DNA aus Stuhlproben erfolgt in gleicher Weise. Stuhlsuspensionen werden allerdings vorher steril filtriert und mit PEG gefällt.

#### Beispiel 9

Wenn nur relativ wenig der N-A, N-B-assozierten Substanz vorliegt, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, die DNA durch Amplifizieren nachzuweisen:

Der Nachweis von Non-A, Non-B-DNA im Serum kann zweckmäßig durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter klonierter Non-A, Non-B-DNA-Probe nach vorangehender spezifischer enzymatischer DNA-Amplifizierung nach bekannter Methode (SAIKI et al., Science **230**, 1350, 1985) erfolgen.

25  $\mu\text{l}$  Serum + 50  $\mu\text{l}$  NaJ (gesättigte Lösung) mischen und 2 Min. bei 37°C inkubieren, danach 10 Minuten bei 0°C inkubieren. Das Inkubat wird auf eine Polycarbonatmembran (z.B. Uni Pore von

Firma BioRadLab) gegen TE-Puffer (10 mmol Tris; 1mmol EDTA) 20 Min. dialysiert. 5  $\mu\text{l}$  des Dialysats werden für die spezifische enzymatische DNA-Amplifikation entnommen. Die Amplifikation erfolgt nach bekannter Methode (SAIKI et al. 1985) mit Hilfe von je 0,5  $\mu\text{g}$  Oligoprimer (Paar A und B bzw. C und D). Die Oligoprimer-Paare werden nach bekannten Sequenzierungsdaten mittels eines DNA-Synthesizers (Applied BioSystem 381) hergestellt. Nach Amplifizierung wird das Reaktionsgemisch auf einem 2%igen Agarosgel elektrophoretisch aufgetrennt, danach auf eine Nylonmembran (Genofit) transferiert und mit einer nach FEINBERG et al. 1983 (Annal. Biochem. **132**, 6-13) mit  $^{32}\text{P}$  markierten klonierten HNANB-DNA-Probe hybridisiert. Nach Autoradiographie werden positive Resultate anhand mitgeführter Standards und Längenmarker identifiziert.

#### Beispiel 10

Nachweis von DNA in geprüft infektiösem Plasmoderivat: Renger F. et al. veröffentlichten in "Deutsches Gesundheitswesen" Vol. 36, S. 560-563 (1981) eine Studie über eine kontrollierte Hepatitis Non-A, Non-B-Epidemie, ausgelöst durch die Applikation infektiöser Antirhesusfaktor D Immunglobulinpräparate. Die Herkunft dieser kontaminierten Präparate konnte vollkommen aufgeklärt werden. Nach Applikation dieses anti-D-Präparates erkrankten 79 % von 116 immunisierten schwangeren Frauen. Dieses anti-D-Präparat (Charge I Ampulle A und C) sowie eine Charge mit niedriger Infektiosität (Charge II Ampulle B und D), die durch das selbe Säulensystem gereinigt wurde, standen zusammen mit Kontrollpräparationen (Gammavenin, Endobolin, Rhesonativ) zur Verfügung. Diese Präparationen wurden zusammen mit Pufferkontrollen, Hepatitis B-Virus-haltigem Serum, Positivkontrollen mit klonierten Virus-DNA-Fragmenten eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mittels DNA-Amplifikation durch die Primer 237-238 (entstammen dem 0,4 Kb EcoRI-Fragment).

#### Ergebnisse:

In mehrfachen, unter verschiedenen Bedingungen durchgeführten Experimenten, fand sich nach Amplifikation ein starkes Signal in der Charge I (Ampulle A und C), ein schwaches Signal bei guter Amplifikationsausbeute in der Charge II (Ampulle B und D). Die drei Kontroll-Lyophilisate Gammavenin, Endobolin und Rhesonativ ergaben kein Signal. Der Zusatz von Hepatitis B-Virus-Genomspezifischen Primern zu den verschiedenen Gammaglobulin-Präparationen ergab ebenfalls keinen Hinweis auf

die evtl. Kontaminierung mit Hepatitis B-Genom. Die mitgeführten Kontrollen dienten der Beurteilung der Effizienz der Amplifikation sowohl mit HBV-spezifischen Primern als auch mit Non-A, Non-B-spezifischen Primern. Der Nachweis der Identität der in der infektiösen Charge befindlichen DNA mit der DNA aus den Feces eines Patienten mit Hepatitis Non-A, Non-B sprechen für die Identifizierung einer in Hepatitis Non-A, Non-B-implizierten DNA.

Die Untersuchung von weiteren 57 Stuhlproben von Patienten mit sporadischer und posttransfusionseller HNANB mittels Radioimmunoassay wie in den vorhergehenden Beispielen beschrieben und im Dot-Blot-Verfahren, ergab eine signifikante Korrelation der beiden Untersuchungsverfahren hinsichtlich nachweisbarer HNANB-assoziierten Substanz (RIA) und nachweisbarer DNA (Dot-Blot, siehe Beispiel 7).

Die beigefügten Abbildungen erläutern die Erfindung:

Fig. 1 ist die Sequenz des Genoms

Fig. 2 ist eine Übersicht über die Schnittstellen mit EcoRI sowie die offenen Leseraster und Leseraster

Fig. 3 und

Fig. 4 zeigen den Plus- und Minusstrang einer ca. 0,3 Kb Sequenz, also einer Teilsequenz des Genoms

Fig. 5 zeigt den offenen Leseraster, und zwar die Leseraster 1A, 2A und 3A, und

Fig. 6 zeigt den offenen Leseraster für die Leseraster 1B, 2B und 3B.

Die Sequenzierung der in den Figuren beigefügten Sequenzen erfolgte nach der Sanger-Methode nach Umklonieren von PUC 8 in M 13 bzw. Bluescript Vektor.

Die Charakterisierung dieser in Fig. 1 gezeigten ursprünglich vorliegenden aus Stuhlisolaten isolierten DNA zeigt, daß es sich um eine partiell doppelsträngige zirkuläre DNA handelt.

Die DNA zeigt Verwandtschaft mit HBV-DNA. Wenn ein kloniertes 0,45 Kb Fragment oder gereinigtes Stuhlmaterial mit  $^{32}\text{P}$  markiert und in einer Southern-Analyse an HBV-DNA hybridisiert wurde, ergaben beide Proben ein Signal, allerdings etwa 1000-fach geringer als mit sich selbst. Plasmid pBR 322 und Lambda Phage ergaben kein Signal. In Vorversuchen konnte die gereinigte Stuhlprobe, ohne denaturiert zu werden, sehr gut mit dem kleinen Fragment der E.coli Polymerase markiert werden.

Mit Klenow Polymerase behandelte Stuhlprobe migrierte in einem Agarosegel deutlich langsamer als die unbehandelte Probe. Dies spricht dafür, daß die untersuchte DNA, ebenso wie HBV-DNA, partiell doppelsträngig ist. Die Ergebnisse und Behandlung mit Restriktionsenzymen und Primerextension beweisen eine circuläre Struktur der DNA.

Die mehrfach durchgeführten Sequenzanalysen beider DNA Stränge ergaben 4998 Basenpaare. Die Sequenz ist vom 5'-zum 3'-Ende dargestellt, die Nummerierung mit 1 beginnt im ersten Nucleotid des 2,5 Kb EcoRI-Fragments in dem DNA-Strang, der die großen offenen Leseraster enthält (siehe Abb. 2). Ein in der Darstellung nicht gezeigtes DNA-Fragment von ca. 10 bis 20 Basenpaaren wurde experimentell nachgewiesen und grenzt an die 2,5 und 1,5 Kb EcoRI-Fragmente und bedingt also den Ringschluß der linear abgebildeten DNA (vgl. Abb. 2). Der Nachweis dieses Fragments wurde durch ein Amplifikationsexperiment erbracht, wobei gereinigte Virus-DNA mit Klenow Polymerase und den beiden synthetischen Primern 13 und 17 inkubiert und die DNA-Sequenz zwischen den Primern mehrfach amplifiziert und nach Elektrophorese durch Southern-Analyse nachgewiesen wurde. Da die beiden Primer an den beiden Enden der sequenzierten DNA liegen, kann eine Amplifizierung eines Fragmentes nur erfolgen, falls die DNA zirkulär vorliegt. Das Virus-Genom besitzt damit eine Gesamtlänge von 5.010 bis maximal 5.050 Basenpaare. Dieses Resultat wird zusätzlich durch unabhängige Southern-Analyse des Genoms bestätigt. Die Restriktionskarte des Genoms liegt vor. Die Reihenfolge z.B. der einzelnen EcoRI-Fragmente ist: 1,5 / 0,45 / 0,3 / 0,15 und 2,5 Kb.

Bezüglich besonderer Merkmale der Sequenz ist auszuführen, daß eine lange palindromische Sequenz (Hairpin) zwischen den Basenpaaren 2.097 und 2.149 am Ende eines offenen Leserasters liegt (Pos. 4, Abb. 2).

An der Position 424 und 3.303 befindet sich je eine "CTG"-Box. Bei der CTG-Box von 3.303 befinden sich auch 2 Repeats, die Sequenzhomologie mit den direkten Repeats der Hepadnaviridae aufweisen.

Die offenen Leseraster finden sich hauptsächlich nur auf einem Strang. Der andere Strang ist wie bei Hepatitis B-Virus-DNA bis auf kleinere Peptide geschlossen. Während der offene DNA-Strang ohne weitere Modifizierung für Proteine bis zu Molekulargewichten über 40.000 codieren kann, sind im Komplementärstrang weite Bereiche aller drei Leseraster geschlossen bis auf 5 Peptide von einem kleineren Molekulargewicht von ca. 6.000 (siehe Abb. 2 und Abb. 5 und 6).

Alle überlappenden Clone ergaben für die gleiche Sequenz identische Resultate mit einer Ausnahme, wo an der Pos. 2.381 in einem Fall G, in einem anderen Fall A gefunden wurde. Ein Sequenzierfehler ist auszuschließen.

Das gibt einen Hinweis darauf, was durch weitere Befunde bestätigt wird, daß Abweichungen von einigen Prozent, insbesondere 1 bis 2 %, in der Regel keinen Einfluß auf die Funktion der Sequenz haben, so daß funktionelle Äquivalente Abweichun-

gen bis 5 %, insbesondere bis 2 % von der Grundstruktur haben können. Das gleiche gilt auch für die von solchen DNAs kodierte Proteine.

Zusammenfassend läßt sich somit folgendes sagen:

Die Non-A, Non-B-assoziierte Substanz ist gekennzeichnet durch die signifikante Bindung an Immunglobuline und die Bindung an Fab2-Bruchstücke gereinigten IgGs, durch Bindung an nicht kollagenbindende Fibronectinspaltprodukte sowie durch die Infektiosität gegenüber menschlichen Zellkulturlinien, die morphologisch darstellbar sind durch virustypische Veränderungen derselben und molekulargenetisch durch den Nachweis einer spezifisch hybridisierenden, gelelektrophoretisch bei einer scheinbaren Größe von 3,2 KB wandernden DNA (ungeschnitten und unter nativen Bedingungen), innerhalb dieser Zellkulturen.

Die in den infizierten Zellen sowie im Serum von Non-A, Non-B-Hepatitis-Patienten nachweisbare DNA hybridisiert mit der aus Non-A, Non-B-Substanz isolierten, ca. 5 KB großen DNA bzw. der aus diesem Material hergestellten klonierten DNA.

Die gesamte Sequenz von ca. 5.000 Basenpaaren gemäß Fig. 1 und eine Teilsequenz von ca. 300 Basenpaaren gemäß Fig. 3 und 4 der klonierten DNA wurden bestimmt und mit bekannten menschlichen DNA-Sequenzen, Phagen-DNA-Sequenzen, Plasmid-DNA-Sequenzen und bekannten publizierten Virus-DNA-Sequenzen verglichen. Sie entsprechen nach diesen Daten keiner bisher beschriebenen Sequenz. Nach dem offenen Leserahmen der Sequenz kann man Rückschlüsse auf die kodierte und exprimierte virusspezifischen Proteine ziehen. Damit kann man die hydrophilen und hydrophoben Regionen innerhalb der Peptide identifizieren und somit ist die Herstellung synthetischer Peptide aus den möglichen antigenen Epitopen in den hydrophilen Regionen möglich.

Die gefundene DNA, insbesondere die auf dieser DNA sich befindlichen Gene können zur Insertion in entsprechende Expressionsvektoren, wie Zellen und Bakterien (z.B. E.coli und Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae* sowie Zellkulturen), und damit zur Herstellung von Virusantigenen benutzt werden. Damit ist die Diagnostik und die Herstellung von Immunreagentien und Vaccinen möglich. Bei der Diagnostik sind insbesondere die Untersuchung auf Infektiosität (Blutkonservenuntersuchung) und die Diagnose einer akuten, chronischen oder zeitlich zurückliegenden Infektion zu nennen. In Zellkulturen hergestellte Antigene sowie die entsprechenden, durch diese Virus-DNA in vivo und in vitro synthetisierten Proteine können zur Erstellung immunologischer Diagnostika benutzt werden. Die DNA-Sequenz läßt sich zur Identifizierung potentieller Virusproteine und deren synthetischer Herstel-

lung, also die Herstellung synthetischer antigenen Peptide, verwenden, ebenso wie sich die DNA bzw. DNA-Teilsequenzen zur Herstellung synthetischer DNA oder RNA bzw. DNA-oder RNA-Fragmente und für den Einsatz derselben als Sonden oder Primer für die Diagnostik einsetzen lassen. Schließlich kann man die DNA bzw. die erstellte DNA-Sequenz zur Herstellung synthetischer Viren (vollkommene DNA-Synthese) und zur Insertion von synthetischer DNA oder DNA-Fragmente in entsprechende Vektoren verwenden, um Virusexpressionsprodukte zu erhalten.

## 15 Ansprüche

1. NANB-Hepatitis assoziierte DNA, enthaltend vor allem die DNA nach Figur 1 sowie funktionelle Äquivalente und Teilsequenzen davon.

2. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 5 %, insbesondere höchstens 2 % Abweichung von der Struktur und/oder der Kettenlänge der DNA nach Fig. 1 zeigt.

3. NANB-Hepatitis assoziierte DNA nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie partiell doppelsträngig zirkulär und aus einem NANB-Hepatitis assoziierten Partikel bzw. aus Virus isoliert ist.

4. DNA-Teilsequenz nach Anspruch 1 -3, dadurch gekennzeichnet, daß sie Fig. 3 bzw. 4 mit maximal 5 %, vorzugsweise maximal 2 % Abweichung entspricht.

5. Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß sie durch eine DNA nach Anspruch 1 bis 4 kodiert sind oder derart kodierten Proteinen entsprechen.

6. Proteine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie den Sequenzen der offenen Leserahmen gemäß Fig. 5 und 6 entsprechen.

7. Verfahren zur Herstellung der NANB-assoziierten DNAs nach Anspruch 1 -4 (sowie der Proteine nach Anspruch 5 und 6) aus Stuhl, Gewebe, Körperflüssigkeiten oder Viruskulturen, dadurch gekennzeichnet, daß das Ausgangsmaterial, ggfs. nach vorheriger Sterilfiltration und Fällung mit PEG bei Stuhlsuspensionen, mit DNase und ggfs. RNase zur Verdauung inkubiert wird, dann ein Dichtegradient, insbesondere CsCl,  $d = 1,3$ , angelegt wird, worauf Dialyse, Verdauung mit Proteinase K, Phenolextraktion, Äthanol-fällung und ggfs. Extraktion und erneute Fällung und Isolierung sowie ggfs. Klonen und ggfs. exprimieren in entsprechenden Vektoren erfolgen.

8. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 als DNA-Sonden zur Diagnose, insbesondere nach klassischen Hybridisierungsverfahren, oder zur Expression in geeigneten Vektoren.

9. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 zur Synthese von Proteinen zur Erzeugung immunologischer Reagentien für den Nachweis von NANB-Hepatitis und zur Erzeugung von Impfstoffen.

5

10. Verwendung der DNAs nach Anspruch 1 bis 4 oder der auf diesen DNAs befindlichen Gene bzw. der entsprechenden DNA-Sequenzen zur Herstellung synthetischer Viren und zur Insertion der natürlichen oder synthetischen DNAs oder DNA-Fragmente in entsprechende Vektoren zur Bildung von Virusexpressionsprodukten und zur Herstellung von Virusantigenen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

10

Fig. 1, S. 1

1 FILE: TONGA.DNA SEQUENCE: 4998BP; 996 A; 1130C; 1087 G; 1

\*\*\* SEQUENCE LIST \*\*\*

(DOUBLE)

		10	20	30	40	50	60
5	5'	GAATTCGCCC	TCTTCTGTTG	ATTCTGATGT	TGCTCTCGGT	GCTTCTGGTC	TTCTTGGCGG
	3'	CTTAAGACGG	AGAAGACAAC	TAAGACTACA	ACGGAGGCCA	CGAAGACCAG	AAGAACCGCC
		70	80	90	100	110	120
		TCCTTTCCAG	AATTTAGGCA	CGTTTCTTTT	CTCTGTTTCT	CTCTTTTGCT	TTGGGCGTGT
		AGAAAAGGTC	TTAAATCCGT	GCAAAGAAAA	GAGACAAAGA	GAGGAAACGA	AACCGGACAA
		130	140	150	160	170	180
		TGTTCTTCGA	ATGCTTTATTA	GAAAGGCGGT	TGACGGATGA	CTTTTCTTGA	TTTCTTCAAA
10		ACAAGAAGCT	TACGAATAAT	CTTTCCGCCA	ACTGCCTACT	GAAAAGAACT	AAAGAAGTTT
		190	200	210	220	230	240
		TCAGTTTTTA	ACCTTTTCGG	TTCTGGTGGC	GCTCTCGTCA	TTGCCGTTGT	TGTTTTTCTT
		AGTCAAAAAT	TGGAAGAGCC	AAGACCACCG	CGAGAGCAGT	AACGGCAACA	ACAAAAAGAA
		250	260	270	280	290	300
		GTCGGCCTCG	GTATTTTATA	GTTCGTAAAG	GATTGGTTGC	CATGGTAGAC	TTTGTTCCTG
		CAGCCGGAGC	CATAAATATT	CAAGCATTTT	CTAACCAACG	GTACCATCTG	AAACAAAGGC
		310	320	330	340	350	360
15		CTCTTGGCGT	TTTACCTCG	TTTATCGCCA	ATGTGCTTTC	TATTTCTTTT	TTTGGCTTTG
		GAGAACCGCA	AAAATGGAGC	AAATAGCGGT	TACAAGAAAG	ATAAAGGAAA	AAACCGAAGC
		370	380	390	400	410	420
		GTACTTTTGG	CAACTTTATT	TTGGTTTGTG	TTTTGCTTTC	GCTTGTGGGC	TTTGTCTCTT
		CATGAAAACC	GTGAAATATA	AACCAACAG	AAAACGAAAG	CGAACAACCG	AAACAAGAGA
		430	440	450	460	470	480
		GTGGCCTTTG	GGATGGAGGT	GATAAATAGT	GGAAATCCCT	ATTATTATCA	ATACTTGGGT
		CACCGGAAAC	CCTACCTCCA	CTATTTATCA	CTTTTAGGGA	TAATAATAGT	TATGAACCCA
		490	500	510	520	530	540
		TGATGCTGAC	GGCGTTACCG	TCTATACAGT	GCAGTATAAA	GATGGTAGCA	CTTGGGATAT
		ACTACGACTG	CGCAATGGC	AGATATGTCA	CGTCATATTT	CTACCATCGT	GAACGCTATA
		550	560	570	580	590	600
		GACCGTCCAG	CAGTATGATT	ATCTCAAGGC	ATCCGGCGAG	GCTGTGCGCG	ATATGGACTC
		CTGGCAGGTC	GTCTACTATA	TAGAGTTCCG	TAGGCGCGTC	CGACAGCGGC	TATACCTGAG
		610	620	630	640	650	660
25		TAAAGCGCGT	GCTGATTCTC	CTTCGGAAGC	TGCTCTGCTT	CCCGAGGAAC	CTGCACAGAA
		ATTTCGGCGA	CGACTAAGAG	GAAGCCTTCG	ACGAGGACGA	GGGCTCCCTG	GACGTGTCTT
		670	680	690	700	710	720
		TATTATTGAA	TCTCTGACC	TCGCGAAGG	TTATGTGCGG	CAGGAAGAAG	AATTACCTTT
		ATAATAACTT	AGAGGACTGG	AGGCGCTTCC	AATACACGGC	GTCTTCTTTC	TTAATGGAAA
		730	740	750	760	770	780
		TGAGGGGAGT	TTAACCGCTT	ATGATGACCG	CGCAGCAGAT	ACTCCGGCTT	TGTATGCTAA
		ACTCCCTCTA	AATTGGCGAA	TACTACTGGC	CGTCTGTCTA	TGAGGCGGAA	ACATACGATT
		790	800	810	820	830	840
30		TCTCCCTAAC	GTCTCTAATA	GTTTCACTAC	TATTATGGAT	TGGTTCCGAG	ATACGTTTTT
		AGAGGGATTG	CAGAGATTAT	CAAAGTGATG	ATAATACCTA	ACCAAGCCTC	TATGCAAAAA
		850	860	870	880	890	900
		TATCGAACGT	ACTGAGACGG	TGCACAAGTC	CGGCTATAAG	TCTGAAAGGT	ATTCTCTATA
		ATAGCTTGCA	TGACTCTGCC	ACGTGTTTCAG	GCGATATATG	AGACTTTTCA	TAAGGATATT
		910	920	930	940	950	960
35		CAGCTCGACT	CAACTTATTC	AGCTTCTCTA	TGCGGAGGAT	TCCACTACTA	CGTCTCAGGT
		GTCGAGCTGA	GTTGAATAAG	TCGAAGGAAT	ACGCCTCTTA	AGGTGATGAT	GCAGAGTCCA

Fig. 1, S. 2

1	970	980	990	1000	1010	1020
	TCTCAATCCG	CAAGCTTGGC	TTTCIGCTTT	GCTTGTGTGC	CTTGTCTTCG	TTACTACTGT
	AGAGTTAGGC	GTTCGAACGC	AAAGACGAAA	CGAACACAG	GAACAGAAGC	AATGATGACA
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
	TACTTGGATT	AAAAACGCGA	TTTGGGGGOG	CATGAGTTAA	TGGAAATTCT	ACCTTTACAG
	ATGAACCTAA	TTTTTGGCGT	AAACCCCGGC	GTAICTCAATT	ACCTTTAAGA	TGGAAATGTC
5	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	TATTGTTTTG	GTATCTTCTC	TGTCCCGGAA	ATTGGCTATT	TCATTGTCTT	CGCTGCTGTT
	ATAACAAAGC	CATAGAAGAG	ACAGGGGCTT	TAACCGATAA	AGTAACAGAA	GCGACGACAA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
	TTCTCTTTGT	TGGTCTCTCT	GCTCCGTCGG	TGACAGGTGC	CATAAATATT	ATTATGAAAG
	AAGAGAAACA	ACCAGGAGGA	CGAGGCAGGC	ACTGTCCACG	GTATTTTATA	TAATACTTTT
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	GATGATGACT	TCAGGGGCGT	ACTTCTTCTA	TTCTCGCTAC	GCTGCTTTCC	TTGGTCGGTG
10	CTACTACTGA	AGTCCCGCGA	TGAAGAAGAT	AAGAGCGATG	CGACGAAAGG	AACCAGCCAC
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	AGTTCTTTAC	CTCGATGATT	ACTTGGATGG	GTCAGCTCAT	TGATTTCTAT	GAGTCTCAGC
	TCAAGAAATG	GAGCTACTAA	TGAACCTACC	CAGTCGAGTA	ACTAAAGATA	CTCAGAGTOG
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
	CCATTCTCCT	TGTCCTCGTG	ATTCTCACFA	TCGCGGGCAT	TGTTCTCCGT	ATCCTTCGCC
	GGTAAGAGGA	ACAGAAGCAC	TAAGAGTGAT	AGCGCCCGTA	ACAAGAGGCA	TAGGAAGCGG
15	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	GCTGGATTCC	TGGTCGCTCC	TAACGACTGA	GAGAAAACGC	CGCCGACCAT	TTTAATGGTC
	CGACCTAAGG	ACCAGCGAGG	ATTGCTGACT	CTCTTTTGCG	GCGGCTGGTA	AAATTACCAG
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
	GGCGAAGTTT	TCTTATTTAG	AAAGGATTAT	TTGTTATGCT	TTATGGTATT	CTTATCTTTT
	CCGCTGCAAA	AGAATAAATC	TTTCCATAA	AACAATAAGA	AATACCATAA	GAATAGAAAA
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	GCGTTTGCTG	GCTTTTTTGT	TATATCGATA	ACTATTGCAA	AAATCCCTAC	AAGCTCGAAG
20	CGCAACGAC	CGAAAAACAA	ATATAGCTAT	TGATAACGTT	TTTAGGGATG	TTGAGGCTTC
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	CTGTGTGG	TTCTAAAGGT	TCTGGCAAGT	CTCTGTATAT	GTCTCGOGTT	GCTGATAAGT
	GACAACAAAC	AAGATTTCCA	AGACCGTTCA	GAGACATATA	CAGAGCGCAA	CGACTATTCA
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
	GGCTTCGTTT	TAGTAAGGGG	TTTATTTATA	GCAATATGGG	TATTGGTTAT	GATTTAGAGC
	CCGAAGCAAG	ATCATTCCCC	AAATAAATAT	CGTTATACCC	ATAACCAATA	CTAAATCTCG
25	1690	1700	1710	1720	1730	1740
	CGGAATATTG	GAAACAGACC	TTTGCCCGTG	ATTCCCTTAT	TCTTATTGAT	GAGATAGGCG
	GCCTTATAAC	CTTTGTCTGG	AAACGGGGAC	TAAGGGAATA	AGAATAACTA	CTCTATCCGC
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
	TGCTCCACTC	TAACCGTGAT	TTTAAGGCTA	TGCCCGGTGA	AGCTGTGAG	TTTTTCAAGA
	ACGAGGTGAG	ATTGGCACTA	AAATTCCGAT	ACGGGGCACT	TCGACAGCTC	AAAAAGTTCT
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
	TGCAGCGCAA	ATATCACTTG	ACAATAGTTG	TATCGTCTCA	GACCATGGAC	TTTGATAAAA
30	ACGTGCGGTT	TATAGTGAAC	TGTTATCAAC	ATAGCAGAGT	CTGGTACCTG	AAACTATTTT
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
	AGATTCTGTA	CCTCTGTGAT	CGCATTTATC	TCTGCAATCG	TATTGGCTGG	TTTTGTGCGC
	TCTAAGCACT	GGAGACACTA	GCGTAAATAG	AGACGTTAGC	ATAACCGACC	AAAACAGCGG
	1930	1940	1950	1960	1970	1980
	TCACCCCTTA	TCGCTCCTGT	ATCGCTATGG	AACACCGTCC	CGAGGGCGGC	CAAGAGCTTG
	AGTGGGGAT	AGCGAGGACA	TAGCGATACC	TTGTGGCAGG	GCTCCCGCCG	GTTCTCGAAC
35	1990	2000	2010	2020	2030	2040
	TTAACACGGT	GCGCAAGGCG	GGCAGGGCTA	AGTGGTATAC	TATCCCAAG	TCTGTGAAGC
	AATTGTGCCA	GCGGTTCCGC	CCGTCCCGAT	TCACCATATG	ATAGGGGTTT	AGACACTTCG


Fig. 1, S. 3

1	2050	2060	2070	2080	2090	2100
	AGGTGAGTGC	CTTAGAATAT	GATACAGAGC	AGGTTATCAG	CAAGACCCCC	TCGAAGTAAA
	TCCACTCAGC	GAATCTTATA	CTATGCTCTG	TCCAATAGTC	GTCTGCGGGG	AGCTTCATTT
	2110	2120	2130	2140	2150	2160
	AAAAAAAAC	TCCCCGTGCC	CCCGTAGGGG	GTTAGGGGAG	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT
5	TTTTTTTTTG	AGGGGCACGG	GGGCATCCCC	CAATCCCCCTC	AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA
	2170	2180	2190	2200	2210	2220
	TACTGGAGCA	CTCCCGCCGT	CTGTGACGCG	GATAGCGTCT	CCACCGCGTC	CCCCGTCCCC
	ATGACCTCGT	GAGGGCGGCA	GAACAGTGCG	CTATCGCAGA	GGTGGCGCAG	GGGGCAGGGG
	2230	2240	2250	2260	2270	2280
	GCGAGGGCAA	AGCCCTCGCC	CTTCCCAAAC	AGACCGGTAG	GGGCTTCCGA	TACGTACTGA
	CGCTCCCGTT	TGGGGAGCGG	GAAGGGTTTG	TCGGCCATC	CCCGAAGGCT	ATGCATGACT
	2290	2300	2310	2320	2330	2340
10	CTGCGGTGAC	GATGGGAAOG	TGGGCGTGCG	TGTAATACGC	CCACGAAATT	TAAATTTCTCT
	GACGGCACTG	CTACCCCTGC	AACCGCAOGC	ACATTATGCG	GGTGCCTTAA	ATTTAAAGGA
	2350	2360	2370	2380	2390	2400
	CTTGACAACT	CATTCACTACT	GTGGTAATAT	TTAGCCATGG	AAATGAAAGG	TGGTTTTCTCT
	GAACGTGTGA	GTAAGTATGA	CACCATATATA	AATCGGTACC	TTTACTTTCC	ACCAAAGAG
	2410	2420	2430	2440	2450	2460
	GTATGAAAAC	GGTTGTAAA	CTTGATTATG	CTACGTTCCG	CTTTGAGCAA	GGTTCATTTT
	CATACCTTTG	CCAACAATTT	GAACATAATC	GATGCAAGCG	GAAACTCGTT	CCAAGTTAAA
15	2470	2480	2490	2500	2510	2520
	CTATTCCCAA	AATCGAAGAT	GCGCTTGCTC	AGTGTGATTT	ACATTTTGCA	CAGATATCTA
	GATAAGGGTT	TTAGCTTCTA	CGGAACGAG	TCACACTAAA	TGTAAAACGT	GTCTATAGAT
	2530	2540	2550	2560	2570	2580
	ACGCAAGTGA	GAATTCCCCC	TACAATTCCC	CTGCGGGACT	CTTCTTTAAG	CCTAACAACG
	TGCGTTCACT	CTTAAGGGGG	ATGTTAAGGG	GACGCCCTGA	GAAGAAATTC	GGATTGTTGC
	2590	2600	2610	2620	2630	2640
20	GCGGAAACA	GTCTCCGCAC	TCTTTACAAG	TGCTGGTCA	TGGTTGTGAG	CTTTTCCGCT
	CGCGCTTTGT	CAGAGGCGTG	AGAAATGTTT	ACAGACCAGT	ACCAACACTC	GAAAAGGCGA
	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	CTACCTTGCC	TOGGCTCGCG	TCCTTGATGC	AGGAAGGTCA	CGAATTGCGT	CACTTTTCTC
	GATGGAACGG	AGCCGAGCGC	AGGAACCTAG	TCCTTCCAGT	GCCTAAGCCA	GTGAAAAGAG
	2710	2720	2730	2740	2750	2760
	GTCTTGACTT	TTGCTTTGAT	GTTGTTATGA	CAAACTACG	GTGGCGTGAG	TTTTATTGTG
	CAGAAGTGAA	AACGAAACTA	CAACAATACT	GTTTTGATGC	CACCGCACTC	AAAATAAACC
25	2770	2780	2790	2800	2810	2820
	GTGTTATCTC	TGCTTCCGTC	GATGAGATGA	ATAATCCCGA	AAAAGCCCGT	AAGGTTCCGA
	CACAATAGAG	ACGAAGGCAG	CTACTCTACT	TATTAGGGCT	TTTTCGGGCA	TTCCAAGCGT
	2830	2840	2850	2860	2870	2880
	AATTCATGTA	TCAGGGCTAT	GGTGATTCCA	CTACCGTTTA	TATCGGTCCG	AGAAAGTCTT
	TTAAGTACAT	AGTCCOGATA	CCACTAAGGT	GATGGCAAAT	ATAGCCAGCG	TCCTTCAGAA
	2890	2900	2910	2920	2930	2940
30	CTGCTGTCTT	CTGCCGTATT	TATAATAAGT	CTCTGCAAGA	CCCTGAAAAA	AAGCTCTGTG
	GACGACAGAA	GACGGCATAA	ATATTATTCA	GAGACGTTCT	GGGACTTTTTT	TTGAGACAC
	2950	2960	2970	2980	2990	3000
	CGGCTTCTGG	TGAGCTTCTG	GACTGCCCTG	ATGATTCTTA	TATTATTCTG	TATGAGATGG
	GCGGAAGACC	ACTCGAAGAC	CTGACGGGAC	TACTAAGAAT	ATAATAAGCA	ATACTCTACC
	3010	3020	3030	3040	3050	3060
	AGTTAAAAAT	TACTTCTCGT	GTGAATCTTT	TTGGCCGTAC	CGTTTATGAC	CCCTCTCCCC
	TCAATTTTAA	ATGAAGAGCA	CACCTAAGAA	AACCGGCATG	GCAAATACTG	GGGAGAGGGG
35	3070	3080	3090	3100	3110	3120
	TCTTTTGGCA	GTATTACGAA	GACCCTGATA	AGCTCTTCCG	CTATCTCCGT	AAAGTCTGGA
	AGAAAACCGT	CATAATGCTT	CTGGGACTAT	TCGAGAAGCG	GATAGAGGCA	TTTCAGACCT

Fig. 1, S. 4

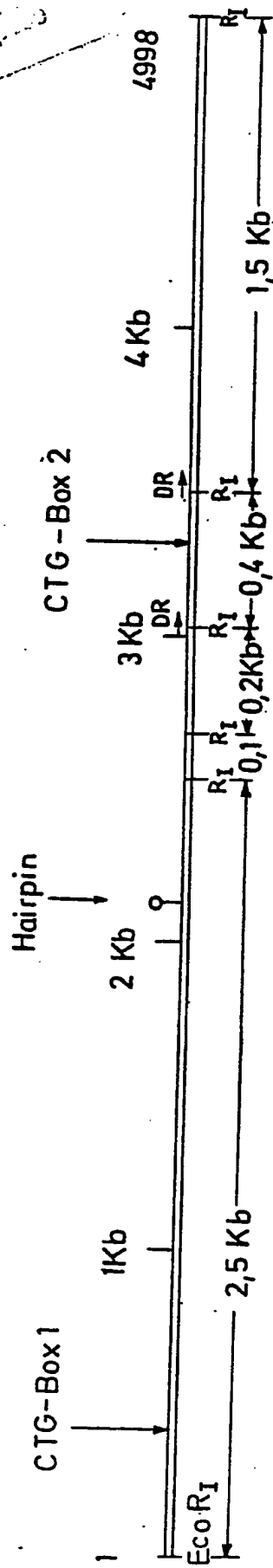
1	3130	3140	3150	3160	3170	3180
	ATCGTTACGG	AAATGATACT	CTTCTCCCTG	ACGGCTGGGA	AGATATGCAG	TTCGTTACTG
	TAGCAATGCC	TTFACIATGA	GAAGAGGGAC	TGCCGACCCT	TCTATACGTC	AAGCAATGAC
	3190	3200	3210	3220	3230	3240
	ATATCGAAGC	TCGCAACATT	CAGTTTACTA	AGGGTTTATT	TCGTCCCTTT	AGTAATGACC
5	TATAGCTTCG	AGCGTTGTAA	GTCAAATGAT	TCCCAAATAA	AGCAGGGGAA	TCATTACTGG
	3250	3260	3270	3280	3290	3300
	TTGCTCAAAA	GTTTTCTGTT	TCTATOCATA	CTGAAGAACA	AAAAATGTCT	TATGTTGCTA
	AACGAGTTTT	CAAAAGACAA	AGATAGGIAT	GACTTCTTGT	TTTTTACAGA	ATACAACGAT
	3310	3320	3330	3340	3350	3360
	ATACCTTTGG	TCATCGTATC	ATTGATATTT	TGCTTTTATCG	TOCTGAGCTG	CTTTTCCCTCG
	TATGGAAACC	AGTAGCATAG	TAACATATAA	ACGAAATAGC	AGGACTCGAC	GAAAAGGAGC
	3370	3380	3390	3400	3410	3420
10	CTTGTGTCAA	GTGGGAGCAG	TTTTATAATG	AGTGTCTTCC	GTCTCTCTCT	CTGGCGCTGA
	GAACAACGTT	CACCCCTCGTC	AAAATATTAC	TCACAGAAGG	CAAGAGAGGA	GACCGGACT
	3430	3440	3450	3460	3470	3480
	CTCAAGTAGT	CGCTCAGTTC	TCTGAGTCTT	CCCGCATTTG	CGTTGAGGAA	TTCGGTGAAG
	GAGTTCATCA	GCGAGTCAAG	AGACTCAGAA	GGCGGTAAAC	GCAACTCCIT	AAGGCACTTC
	3490	3500	3510	3520	3530	3540
	TTCGTGATGA	CCCCCTCTCC	TTTAGTGAAG	ATGGGTTTGA	TGATATATCT	TTATTCTGAT
	AACGACTACT	GGGAGAGGG	AAATCACTTC	TACCCAAACT	ACTATATAGA	AATAAGACTA
15	3550	3560	3570	3580	3590	3600
	GAAAGGATTG	TTCCTTTGTG	AAAGTTACTG	TAGTTGGTAA	GTCCCACCGC	GCTGGTACAT
	CTTTCTTAAC	AAOGAAACAC	TTTCAATGAC	ATCAACCATT	CAGGGTGGCG	CGACCATGTA
	3610	3620	3630	3640	3650	3660
	CTAAGCAGGG	CAAAGACTAT	GATTTTCTTA	CTCTCATGGC	CGAATATTGG	ATGCGTGCAG
	GATTCTGTC	GTTTCTGATA	CTAAAAGAT	GAGAGTACCG	GCTTATAAGC	TACGCACGTT
	3670	3680	3690	3700	3710	3720
20	ATGATGACAA	TGATGGGGTG	CAGGTGATA	GAATCAATGT	TGACGCTCGC	ATGATGCCGT
	TACTACTGTT	ACTACCGCAC	GTCCAACAT	CTTAGTTACA	ACTGCGAGCG	TACTACGGCA
	3730	3740	3750	3760	3770	3780
	ATGCGCTCAT	TGTCGTTGGC	GCTACGTATG	ACCTTGACTT	TGACCGTAAC	GGATATCTTC
	TACGCGAGTA	ACAGCAACCG	CGATGCATAC	TGGAACGTAA	ACTGGCATTG	CCTATAGAAG
	3790	3800	3810	3820	3830	3840
	TOGGAATTGA	GGAAGTCTAA	CTCCCTTTGT	TCAAACCTAA	ATTTTCATTTC	CTATGGGAGA
	AGCCTTAAC	CTTTCAGATT	GAGGGAAACA	AGTTTGGATT	TAAAGTAAAG	GATACCCTCT
25	3850	3860	3870	3880	3890	3900
	GCGGTTCCGC	GCTCTCACAT	GGCGGGGTAG	TGCAATGGTC	GCATGTCACT	CTCTGAAGGT
	CGCCAAGCGG	CGAGAGTGTA	CGCCCCATC	ACGTTACCAG	CGTACAGTGA	GAGACTTCCA
	3910	3920	3930	3940	3950	3960
	GAAGCTGCTG	GTTGGAATCC	AGACCCCGCA	ACCAAAACGG	ATTTGACCTC	CGTTATTGCA
	CTTCGACGAC	CAAGCTTAGG	TCTGGGGCGT	TGGTTTTGCC	TAAACTGGAG	GCAATAAGCT
	3970	3980	3990	4000	4010	4020
30	TGTCGCGAAA	GGTGGTGGCG	AAGTATGAA	AAAGCATCGG	TGTTTTTATA	AGCGTTTCGC
	ACAGCGCTTT	CCACCACCGC	TTCACTACTT	TTTGGTAGCC	ACAAAAATAT	TCGCAAAGCG
	4030	4040	4050	4060	4070	4080
	CGCCCTTCTC	GCGTCTTTGA	TGGTTTCTTT	TTCTTGTGT	ACTCCTTGTT	TTGCTGGATT
	GCGGGAAGAG	CGCAGAAACT	ACCAAAGAAA	AAGGAACACA	TGAGGAACAA	AACGACCTAA
	4090	4100	4110	4120	4130	4140
	TGACTCTGAA	GCTGATATGC	CATCTTTGGA	TGATTTCTAT	ACTCATCATG	GTTTCATGGTT
	ACTGAGACTT	CGACTATACG	GTAGAAACCT	ACTAAAGATA	TGAGTAGTAC	CAAGTACCAA
35	4150	4160	4170	4180	4190	4200
	TGTTTGGCGT	AGTGCTACTA	TTTCTGGCTT	TCCTTTTTAT	GAGTTGCTTT	GCTCTCCTAT
	ACAAACCGCA	TCACGATGAT	AAAGACCGAA	AGGAAAAATA	CTCAACGAAA	CGAGAGGATA





35

Fig. 2



Offene Leserahmen

Leseraster

1 A

2 A

3 A

1 B

2 B

3 B

3

2

5

2

4

2

1

3

5

2

4

1

7

6

1

4

1

4

2

3

1

SEQUENCE ID: N8 - pUC19

OPTIONS:  
PLUS STRAND  
ALL  
START ATG ♦ NOT OPENFRAME  
ONE LETTER CODE

5'1 TGCAGTTGCTTACTGATATCGAAGCTGGCAACATTCAGTTTACTAGGTTTATTTGCTCCCTTAGTAAT 1  
C S S L L I S K L A T F S L L R F I C S P \* \* \* 2  
A V R Y \* Y R S S Q H S V Y \* G L F A P L S N 3  
Q F V T D I E A R N I Q F T K V Y L L P L V (M)  
71 GACCTTGCTCAAAAGTTTCTGTTTCTATCCATCTAGAGACAAAATGCTTATGTTGCTAATACCT 1  
P C S K V F C F Y P Y \* R T K N V L C C \* Y L 2  
D L A Q K F S V S I H T E E Q K (M) S Y V A N T F 3  
T L L K S F L F L S I L K N K K C L (M) L L I P  
141 TTGGTCATCGTATCATATTTTTCGTTTATCGTCCGAGCTGCTTTTCTCGCTTGCTTGCAGTGGGA 1  
W S S Y H \* Y F A L S S \* A A F P R L L Q V G 2  
G H R I I D I L L Y R P E L L F L A C C K W E 3  
L V I V S L I F C F I V L S C F S S L V A S G S  
211 GCAGTTTATATGAGTGTCTCGTTCTCTCCCTCGGCTGACTCAAGTAGTGGCTCAGTCTCAG 1  
A V L \* \* V S S V L S S G A D S S S R S V L \* V 2  
Q F Y N E C L P F S P L A L T Q V V A Q F S E 3  
S F I (M) S V F R S L L W R \* L K \* S L S S L S  
281 TCTTCCCCCATGCGGTTGAG 1  
F P H C R \* 2  
S S P I A V E 3  
L P P L P L

Fig. 3

SEQUENCE ID: N8 - pUCL9

OPTIONS:

MINUS STRAND

ALL

START ATG 0 NOT OPENFRAME

ONE LETTER CODE

301 CTCAAGCGCAATGGGAGACTCAGAGAACTGAGCGACTACTTGAGTCAGCGCCAGAGAGCAACGGA

L N G N G G R L R E L S D Y L S Q R Q R R E R K  
S T A (M) G E D S E N \* A T T \* V S A R G E N G  
Q R Q W G K T Q R T E R L L E S A P E E R T E

1  
2  
3

231 AGACACTCATATATAAAGCTGCTCCACTTGCAACAGCGAGGAAAGCAGCTCAGGACGATAAAGCAAAA

T L I I K L L P L A T S E K Q L R T I K Q N  
R H S L \* N C S H L Q Q A R K S S S G R \* S K I  
D T H Y K T A P T C N K R G K A A Q D D K A K

1  
2  
3

161 TATCAATGATACGATGACCAAGGTATTAGCAACATAACACATTTTGTTCATGATGATAGAAAC

I N D T M T K G I S N I R H F L F S (M) D R N  
S (M) I R \* P K V L A T \* D I F C S S V W I E T  
Y Q \* Y D D Q R Y \* Q H K T F F V L Q Y G \* K Q

1  
2  
3

91 AGAAAACCTTTGAGCGAGGTCAATTACTAAGCGGAGCAAAATAAACCTAGTAACTGATGTCGAGCTT

R K L L S K V I T K G S K \* T L V N \* (M) L R A S  
E N F \* A R S L L R G A N K P \* \* T E C C E L  
K T F E Q G H Y \* G E Q I N L S K L N V A S F

1  
2  
3

21 CGATAATCAGTAAAGCACTGCA

I S V T N C  
R Y Q \* R T A  
D I S N E L

1  
2  
3

Fig. 4

Fig. 5 (S. 1)

1 \*\*\* INITIATION/TERMINATION REFERENCE \*\*\*

INITIATION POSITION						TERMINATION POSITION						
***** FRAME 1 *****												
5	157	311	433	1060	1309	1435	19	25	139	151	286	481
	1483	1669	1729	2059	2377	2383	487	517	526	556	601	613
	2428	2479	2620	2719	2782	2839	667	676	721	742	745	778
	2971	2992	3046	3133	3235	3292	787	796	799	853	883	898
	3388	3487	3511	3520	3619	3661	1030	1171	1183	1195	1276	1339
	3664	3670	3673	3697	3721	3748	1408	1675	1735	1819	1825	2035
	3859	3883	4135				2044	2053	2125	2278	2287	2365
10							2404	2665	2728	2788	3004	3022
							3418	3427	3559	3571	3712	3868
							4009	4081	4087	4093	4111	4150
							4180	4252	4261	4279	4300	4354
							4393	4468	4498	4531	4549	4636
							4642	4720	4765	4828	4882	4888
							4897	4945	4957	4972	4981	4987
15	TOTAL : 39						TOTAL : 84					
***** FRAME 2 *****												
	131	539	593	815	1052	1202	158	266	440	443	1058	1259
	1205	3539	3833	3875	3986	4040	1301	1310	1433	1529	1574	1613
	4097	4385					1616	1631	1634	1649	1670	1709
							1727	1730	1751	1757	1763	1778
20							1853	1856	1868	1877	1982	2009
							2060	2258	2372	2384	2417	2423
							2444	2495	2519	2528	2567	2573
							2627	2705	2717	2747	2783	2792
							2810	2843	2903	2906	2924	2951
							2969	2972	2993	3047	3086	3089
							3110	3134	3149	3179	3209	3230
							3233	3236	3272	3299	3323	3344
25							3386	3389	3443	3464	3476	3485
							3488	3503	3506	3518	3521	3578
							3602	3620	3662	3665	3671	3686
							3689	3701	3749	3755	3761	3767
							3788	3818	3944			
30	TOTAL : 14						TOTAL : 99					
***** FRAME 3 *****												
	27	282	483	522	555	693	75	168	189	258	447	540
	741	744	774	930	1194	1275	732	1053	1203	1206	1401	1458
	1287	1476	1599	1656	1770	1800	2097	2133	2193	2313	2331	2343
	1845	1947	2292	2403	2667	2727	3537	3540	3798	3894	3900	3984
	2787	2826	2997	3165	3285	3636	3987	4038	4275	4386	4455	4539
	3651	3711	3714	3960	4110	4128	4686	4992				
	4179	4254	4263	4299	4305	4353						
35	4446	4620	4722	4932	4944							
	TOTAL : 47						TOTAL : 32					

\*\*\* MOLECULAR WEIGHT \*\*\*

Fig. 5 (S. 2)

Fig. 5 (S. 2)

	START	END	MOLECULAR WEIGHT		NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
	***** FRAME 1 *****							
5	157	286	4842.59	1	3046	3418		13607.00
	331	481	5857.77	2	3133	3418		10646.71
	433	481	1911.04	3	2428	2665		9020.45
	1060	1171	4219.95	4	1435	1675		8907.70
	1309	1339	1055.14	5	2479	2665		7032.09
	1435	1675	8907.70	6	1483	1675		6959.42
	1483	1675	6959.42	7	3235	3418		6919.29
	1669	1675	262.36	8	2839	3004		6213.38
10	1729	1735	305.39	9	331	481		5857.77
	2059	2125	2514.97	10	3721	3868		5519.15
	2377	2404	1011.23	11	157	286		4842.59
	2383	2404	750.93	12	3883	4009		4697.94
	2428	2665	9020.45	13	3292	3418		4696.55
	2479	2665	7032.09	14	3748	3868		4490.94
	2620	2665	1563.81	15	1060	1171		4219.95
	2719	2728	375.51	16	3619	3712		3648.43
15	2782	2788	305.39	17	3487	3559		2767.29
	2839	3004	6213.38	18	2059	2125		2514.97
	2971	3004	1408.75	19	3661	3712		1946.41
	2992	3004	578.66	20	433	481		1911.04
	3046	3418	13607.00	21	3511	3559		1887.18
	3133	3418	10646.71	22	3664	3712		1815.22
	3235	3418	6919.29	23	3520	3559		1585.79
20	3292	3418	4696.55	24	3670	3712		1582.93
	3388	3418	1294.51	25	2620	2665		1563.81
	3487	3559	2767.29	26	3673	3712		1451.74
	3511	3559	1887.18	27	2971	3004		1408.75
	3520	3559	1585.79	28	3388	3418		1294.51
	3619	3712	3648.43	29	1309	1339		1055.14
	3661	3712	1946.41	30	2377	2404		1011.23
	3664	3712	1815.22	31	2383	2404		750.93
25	3670	3712	1582.93	32	2992	3004		578.66
	3673	3712	1451.74	33	3697	3712		547.68
	3697	3712	547.68	34	4135	4150		535.70
	3721	3868	5519.15	35	2719	2728		375.51
	3748	3868	4490.94	36	1729	1735		305.39
	3859	3868	277.33	37	2782	2788		305.39
	3883	4009	4697.94	38	3859	3868		277.33
30	4135	4150	535.70	39	1669	1675		262.36
	***** FRAME 2 *****							
	131	158	1002.19	1	539	1058		19095.03
	539	1058	19095.03	2	593	1058		17110.92
	593	1058	17110.92	3	815	1058		9231.94
	815	1058	9231.94	4	3833	3944		4193.88
	1052	1058	236.28	5	3875	3944		2659.22
35	1202	1259	2324.59	6	1202	1259		2324.59
	1205	1259	2193.40	7	1205	1259		2193.40
	3539	3576	1532.78	8	3539	3576		1532.78
	3833	3944	4193.88	9	131	158		1002.19
	3875	3944	2659.22	10	1052	1058		236.28

Fig. 5 (S. 3)

1			***** FRAME 3 *****			
	27	75			1	2403 3537 43550.02
5	282	447	1815.23		2	2667 3537 34028.78
	483	540	5855.63		3	2727 3537 31646.22
	522	540	2003.43		4	2787 3537 29263.59
	555	732	616.78		5	2826 3537 27663.74
	693	732	7063.49		6	1476 2097 24121.86
10	741	1053	1636.98		7	2997 3537 21162.74
	744	1053	11799.97		8	1599 2097 19440.48
	774	1053	11668.78		9	1656 2097 17213.04
	930	1053	10510.39		10	3165 3537 14339.49
	1194	1203	4670.61		11	1770 2097 12848.35
15	1275	1401	334.43		12	741 1053 11799.97
	1287	1401	4929.75		13	744 1053 11668.78
	1476	2097	4398.11		14	1800 2097 11612.94
	1599	2097	24121.86		15	774 1053 10510.39
	1656	2097	19440.48		16	4722 4992 10224.42
20	1770	2097	17213.04		17	1845 2097 9839.93
	1800	2097	12848.35		18	3285 3537 9689.43
	1845	2097	11612.94		19	555 732 7063.49
	1947	2097	9839.93		20	4110 4275 6361.00
	2292	2313	5672.19		21	3636 3798 6115.51
25	2403	3537	766.90		22	282 447 5855.63
	2667	3537	43550.02		23	4128 4275 5690.14
	2727	3537	34028.78		24	1947 2097 5672.19
	2787	3537	31646.22		25	3651 3798 5533.90
	2826	3537	29263.59		26	1275 1401 4929.75
30	2997	3537	27663.74		27	930 1053 4670.61
	3165	3537	21162.74		28	1287 1401 4398.11
	3285	3537	14339.49		29	4179 4275 3784.82
	3636	3798	9689.43		30	4299 4386 3385.17
	3651	3798	6115.51		31	3711 3798 3278.61
35	3711	3798	5533.90		32	3714 3798 3147.42
	3714	3798	3278.61		33	4305 4386 3140.83
	3960	3984	3147.42		34	4620 4686 2646.26
	4110	4275	918.13		35	4932 4992 2321.86
	4128	4275	6361.00		36	483 540 2003.43
	4179	4275	5690.14		37	4944 4992 1867.26
	4254	4275	3784.82		38	27 75 1815.23
	4263	4275	923.20		39	693 732 1636.98
	4299	4386	522.68		40	4353 4386 1350.57
	4305	4386	3385.17		41	4254 4275 923.20
	4353	4386	3140.83		42	3960 3984 918.13
	4446	4455	1350.57		43	2292 2313 766.90
	4620	4686	395.51		44	522 540 616.78
	4722	4992	2646.26		45	4263 4275 522.68
	4932	4992	10224.42		46	4446 4455 395.51
	4944	4992	2321.86		47	1194 1203 334.43
			1867.26			





Fig. 6 (S. 2)

1 \*\*\* MOLECULAR WEIGHT \*\*\*

	START	END	MOLECULAR WEIGHT	NO.	START	END	MOLECULAR WEIGHT
	***** FRAME 1 *****						
5	514	553	1629.87	1	3946	4042	3550.03
	1399	1432	1344.47	2	514	553	1629.87
	3946	4042	3550.03	3	1399	1432	1344.47
	***** FRAME 2 *****						
	203	245	1707.87	1	3569	3881	11635.17
	863	1142	10853.68	2	1172	1466	11262.47
	896	1142	9431.19	3	863	1142	10853.68
10	1115	1142	1115.33	4	896	1142	9431.19
	1139	1142	149.21	5	2621	2837	7747.28
	1172	1466	11262.47	6	2642	2837	6866.30
	1685	1781	3768.36	7	1685	1781	3768.36
	1730	1781	1988.33	8	4778	4859	3218.74
	2378	2393	656.78	9	1730	1781	1988.33
	2495	2498	149.21	10	203	245	1707.87
15	2621	2837	7747.28	11	1115	1142	1115.33
	2642	2837	6866.30	12	2378	2393	656.78
	3569	3881	11635.17	13	3875	3881	277.38
	3875	3881	277.38	14	4427	4433	246.32
	4427	4433	246.32	15	1139	1142	149.21
	4778	4859	3218.74	16	2495	2498	149.21
	***** FRAME 3 *****						
20	870	1044	6984.76	1	870	1044	6984.76
	873	1044	6853.57	2	873	1044	6853.57
	1002	1044	1764.94	3	1269	1380	4059.50
	1269	1380	4059.50	4	1287	1380	3436.80
	1287	1380	3436.80	5	2172	2244	2682.96
	1362	1380	748.87	6	4716	4779	2652.92
	1542	1563	879.86	7	1800	1872	2593.86
	1677	1686	418.54	8	3816	3876	2182.40
25	1800	1872	2593.86	9	3114	3159	1826.12
	2172	2244	2682.96	10	1002	1044	1764.94
	2646	2667	838.92	11	3639	3681	1629.97
	3114	3159	1826.12	12	1542	1563	879.86
	3153	3159	248.34	13	2646	2667	838.92
	3639	3681	1629.97	14	1362	1380	748.87
	3675	3681	206.26	15	1677	1686	418.54
30	3699	3705	236.28	16	3153	3159	248.34
	3816	3876	2182.40	17	3699	3705	236.28
	4716	4779	2652.92	18	3675	3681	206.26



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 88 10 2469

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.4)
X	WO-A-84 001 107 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) * Insgesamt * ---	1-10	C 12 N 15/00 A 61 K 39/29 C 12 Q 1/68 G 01 N 33/576
X	EP-A-0 124 896 (SEELIG) * Beispiel 7 * ---	7	
A	EP-A-0 066 296 (EISAI CO., LTD) ---		
A	WO-A-82 003 330 (TREPO) ---		
A	RECHERCHE, Band 14, Nr. 145, Juni 1983, Seiten 854-865, Paris, FR; A. ZOTOV: "Les hépatites" ---		
P,A	EP-A-0 242 300 (INSTITUT PASTEUR) -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.4)
			C 12 N A 61 K
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 29-04-1988	Prüfer SKELLY J.M.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		I : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument ----- & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	